

合霉素作用机制的研究

I. 合霉素对痢疾杆菌含氮、磷化合物代谢的影响*

陈知本

(南京药学院)

导师 张宽厚教授

(中国医科大学微生物教研组)

合霉素系化学合成的含有右旋异构体及左旋异构体各一半的等旋混合物, 其中的左旋异构体即是氯霉素。因此, 合霉素的抗菌谱、作用方式以及理化性质均与氯霉素相同。由于合霉素具有广泛的抗菌谱, 对许多传染病均有疗效, 是目前临床上广泛应用的抗菌素之一。细菌对合霉素在体内体外均可产生耐药性^[1-4]。虽耐药性的形成不如对青霉素的显著, 但据近年报告, 耐药菌株仍屡有发生^[5-8], 因此, 亦给治疗上带来了不少困难。对于氯霉素的作用机制以及细菌对氯霉素产生耐药性的机制方面, 很多学者进行了不少工作^[9], 尤其在它对细菌蛋白质及核酸的影响这一方面所进行的探讨为数较多。Gale^[10-12]、Wisseman^[13,14]、Maxwell^[15]、Harrington^[16]等氏均曾进行氯霉素对蛋白质及核酸合成的影响研究, Wisseman 等氏^[14]还研究了氯霉素对氨基酸合成蛋白质的影响。但在对核酸合成的影响方面, 结果并不完全一致, 多数认为氯霉素不抑制细菌核酸的合成; 最近Doudney氏^[17]以同期分裂法进行研究, 认为氯霉素对核酸的合成在细菌不同的生长时期有所不同。总之, 在这方面还有不同的见解, 因此, 有进一步研究的必要。

本实验选定从临床分离所得的对合霉素敏感和耐药的福氏痢疾杆菌(*Shigella flexneri*) IIa 型各一株作为研究对象, 观察: (1) 合霉素对这两个菌株菌体内蛋白质、磷脂、核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、磷蛋白、游离氨基酸等合成的影响; (2) 合霉素对培养基中蛋白质、氨基酸和总磷等含氮、磷化合物的利用的影响; (3) 合霉素对有关含氮化合物代谢的几种酶类——转氨酶、谷酰胺酶、谷氨酸脱氨酶、谷氨酸脱羧酶——的活性的影响。

一、实验材料与方法

菌种 从临床分离所得的对合霉素敏感及耐药的福氏痢疾杆菌 IIa 型各一株 (分别为 26558 号及 28401 号)。26558 号的敏感度为 3.13 微克/毫升, 为敏感菌株; 28401 号的敏感度为 400 微克/毫升, 为耐药菌株。均保存于半固体培养基中。

抗菌素 合霉素为东北制药厂产品, 以蒸馏水配制成各种浓度。

培养基 以肉膏-酵母膏汤(肉膏 0.15%, 酵母膏 0.3%, 磷酸氢二钾 1.0%, 氯化钠 0.5%, 蛋白胨 1.0%, pH 7.6)供菌体及培养液上清中蛋白质、磷脂、核糖核酸、脱氧核糖核酸、磷蛋白、总磷等含量测

本文 1962 年 4 月 23 日收到。

* 本文是在中国医学科学院进修时写成。

定,以及轉氨酶、谷酰胺酶等活性的測定之用。用綜合培养基(KH_2PO_4 0.05%, Na_2HPO_4 0.4%, Na_2SO_4 0.08%, NaNO_3 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05%, 谷氨酸 0.05%, 丙氨酸 0.05%, 絲氨酸 0.01%, 門冬氨酸 0.01%, 尼克酸 0.00003%, 泛酸鈣 0.0001%, 尿嘧啶 0.002%, 葡萄糖 0.2%)作氨基酸的吸收和菌体游离氨基酸的測定之用。使用营养琼脂(BBL牌)作为測定細菌对谷氨酸的氧化、脫氨、脫羧之用。

菌体及上清的制备 取菌种接种于 2 毫升肉湯小管中,置 37°C 培养 6 小时后,取 0.5 毫升培养液移种于 50 毫升培养基中(500 毫升錐形瓶中装 50 毫升培养基),置旋轉搖床上于 30°C 振荡培养 8 小时,然后加入等量含有合霉素的培养基。

合霉素的最后浓度 26558 号为 0.8 微克/毫升,28401 号为 100 微克/毫升。对照瓶中加入等量不含合霉素的培养基。繼續振荡培养 2 小时。2 小时后将培养液以远心沉淀法收集菌体及上层清液(簡称上清),上清又以 10,000 rpm 高速冷冻远心沉淀 20 分钟,以除去上清中的残余菌体。保留上清以备測定其中的蛋白質、总磷等。菌体部分以蒸餾水洗滌三次,并稀释成一定的浓度,供測定菌体中蛋白質、磷脂、RNA、DNA、磷蛋白等用。

菌体游离氨基酸的制备 主要系根据 Gale 氏的方法^[18]加以适当的改变。取菌种接种于肉湯管中,于 37°C 培养 6 小时后取 0.5 毫升培养液移种于 100 毫升培养基中,置 37°C 培养 10 小时后加入合霉素,合霉素的最后浓度,26558 号菌株为 0.8 微克/毫升,28401 号菌株为 100 微克/毫升,对照则不加合霉素。繼續培养 62 小时(共 72 小时),取出后以远心沉淀分离菌体与上清。上清用来測定氨基酸的利用。菌体部分以蒸餾水洗滌三次,将菌体稀释成一定浓度,置开水浴中煮沸 20 分钟,然后用远心沉淀法除去菌体,上清中即含有菌体的游离氨基酸。

无細菌酶液的制备 菌种的接种与菌体及上清的制备相同,但于振荡培养 6 小时后,加入等量含有合霉素的培养基,合霉素的最后浓度,26558 号菌株为 2 微克/毫升,28401 号菌株为 400 微克/毫升。繼續培养 2 小时,然后以远心沉淀法将菌液与上清分离。菌体以 pH 6.8 的磷酸盐緩冲液洗滌二次,将水完全傾去后,称菌体湿重,再加入等量中性玻璃粉以电动細菌研磨器于冰浴中研磨 10 分钟,加入 4 倍容积的 pH 6.8 磷酸盐緩冲液,搖匀,远心沉淀,上清即为无細胞酶液。

合霉素对谷氨酸氧化、脫羧与脫氨作用影响的測定 以 Warburg 氏技术^[19]測定。谷氨酸的浓度为 0.01M,合霉素浓度为 500 微克/毫升,以 16 小时培养物作成靜息細胞悬液("Atago"牌光电比色計,66 号滤板,透光度为 0.9%),此液含氮量为 0.2—0.4 毫克/毫升。試驗进行 120 分钟,每 30 分钟記錄一次結果。

化学測定 总氮按微量凱氏(Kjeldahl)法^[20]測定;蛋白質用 Lowry 氏法^[21]測定,以酪氨酸为标准,并以此折算出相当于白蛋白的量;磷脂、总磷均以抗坏血酸法^[22]測定,而磷脂系由其含磷量折算;RNA 用二羥基甲苯(Orcinol)法^[23]測定;DNA 以二苯胺(Diphenylamine)法^[24]測定;磷蛋白以 Lowry 氏法^[21]測定其中的蛋白質含量来表示之。谷-丙轉氨酶用 Tonhazy 氏法^[25]測定;谷酰胺酶根据中国医学科学院生化系法^[26]測定。每种測定均重复 6 次,取其中一次数值做代表。

氨基酸測定 应用紙上层离技术(上行型)。第一相溶媒系統为丁醇:醋酸:水(4:1:1),第二相溶媒系統为酚:水(80:20)。

二、实 驗 結 果

合霉素对痢疾杆菌菌体中含氮、磷化合物合成的影响 为了观察合霉素对菌体中含氮、磷化合物的影响,进行了菌体中蛋白質、游离氨基酸、磷脂、RNA、DNA、磷蛋白等含量的測定,其結果见表 1 及表 2。

由表 1 可以看出,敏感菌株于加入合霉素后,蛋白質及磷蛋白的含量均减少;耐药菌株菌体蛋白質于加药后含量减少,而磷蛋白則无显著变化。敏感及耐药菌株菌体中磷脂及

RNA 的含量于加药后均增加。

表 1 合霉素对痢疾杆菌菌体中蛋白质、磷脂、RNA、DNA 及磷蛋白等的影响

菌株号	合霉素量 (微克/毫升)	蛋白质 (毫克)	磷脂 (毫克)	RNA (毫克)	DNA (毫克)	磷蛋白 (毫克)
26558	—	15.5	5.27	0.87	0.60	8.0
	0.8	13.8	6.33	1.60	0.55	6.7
28401	—	16.8	4.86	0.95	0.52	7.6
	100	14.5	6.00	1.18	0.58	7.1

注：所有成分的含量均按每毫克菌体总氮计算，即毫克/毫克菌氮。

表 2 合霉素对痢疾杆菌菌体中游离氨基酸的影响

菌株号	合霉素量 (微克/毫升)	甘氨酸	丙氨酸	丝氨酸	缬氨酸	谷氨酸	胱氨酸	酪氨酸
26558	—			+			+	+
	0.8			+			+	-
28401	—	+	+		+	+		
	100	+	-		-	-		

注：“+”表示具有该种氨基酸；“-”表示没有。

从表 2 的结果可以看出，敏感菌株和耐药菌株菌体中的游离氨基酸种类完全不相同，二者于加药后氨基酸种类均减少，而耐药菌尤为显著。

合霉素对痢疾杆菌利用培养基中含氮、磷化合物的影响 为了了解合霉素对于营养物质利用的影响，观察了培养基中蛋白质、总磷及氨基酸的变化。其结果见表 3 及表 4。

表 3 合霉素对培养基中蛋白质及总磷利用的影响

菌株号	合霉素量 (微克/毫升)	蛋白质 (毫克)	总磷 (毫克)
培养基	—	27.2	0.92
26558	—	35.3	1.52
	0.8	27.4	1.64
28401	—	23.8	1.12
	100	48.1	1.53

注：各成分均按培养基每毫克总氮计算。

表 4 合霉素对培养基中氨基酸利用的影响

菌株号	合霉素量 (微克/毫升)	天门冬氨酸	丙氨酸	丝氨酸	谷氨酸	缬氨酸
培养基	—	+	+	+	+	
26558	—	+	+	+	+	+
	0.8	-	+	+	+	+
28401	—		+	+	+	
	100		+	+	+	

注：“+”表示有这种氨基酸；“-”表示没有。

由表 3 可以看出，敏感菌株的培养基中的蛋白质于加药后与原来培养基者相近，而不加合霉素者则增加；耐药菌株则恰恰相反，不加合霉素者较原来培养基中的含量为低，加入合霉素以后含量增加 76.84%。总磷含量则无论敏感菌株或耐药菌株，加药或不加药均较原来培养基者为多。

培养基中的氨基酸利用情况，从表 4 可以看出，敏感菌株与耐药菌株不同。在敏感菌株培养液上清中出现原来培养基中没有的缬氨酸；而在耐药菌株无论加药与否，只有三种氨基酸存在。可见敏感菌株与耐药菌株在氨基酸的需要以及合成的能力上是不同的。

合霉素对痢疾杆菌几种有关含氮化合物代谢的酶的影响 为了观察合霉素对含氮化合物代谢过程中的酶的活性的影响，选择了转氨酶、谷酰胺酶、谷氨酸脱氨酶以及谷氨酸

表 5 合霉素对有关含氮化合物代谢的几种酶的活性的影响

菌株号	合霉素量 (微克/毫升)	转氨酶 (丙酮羧微升数)	谷酰胺酶 (NH ₃ 微克数)	谷氨酸脱羧酶 QCO ₂ (N)	谷氨酸脱氨酶 (NH ₃ 微克数)
26558	—	0.0042	0.0186	34.74	1.6
	2.0	0.0042	0.0150	56.57	1.6
28401	—	0.0024	0.0197	11.0	1.0
	400	0.0024	0.0164	4.28	0.8

注：酶的活性均按酶液每毫克蛋白质计算。

脱羧酶等几种酶作为观察对象。结果列于表 5。

从表 5 可以看到，合霉素对转氨酶的活性无论敏感菌株或耐药菌株均无影响，而合霉素对耐药菌株的谷氨酸脱氨酶、谷氨酸脱羧酶以及谷酰胺酶的活性均有抑制作用；敏感菌株则仅谷酰胺酶的活性于加药后稍见降低，而谷氨酸脱羧酶的活性增高，谷氨酸脱氨酶则无改变。

三、讨 论

敏感菌株的菌体蛋白质及磷蛋白的含量于加入合霉素以后均见降低，前者减少11%，后者减少16%。同时从培养基中蛋白质含量的变化来看，敏感菌株加入合霉素后培养基中蛋白质含量与培养基对照者相似，即未被利用；因而可以认为敏感菌株菌体蛋白质的合成受到合霉素的抑制。Gale^[10-12]，Wisseman^[13, 14]，Maxwell^[15]，Bernlohr 和 Webster^[27] 以及 Harrington^[16] 等氏亦均报告氯霉素对菌体蛋白质的合成有抑制作用，但在抑制率上根据 Gale^[10-12] 及 Wisseman^[13, 14] 等氏的报告，均在 70% 以上，而在我们的实验中只有 11%，这可能是由于研究的菌种以及方法不完全相同所致。耐药菌株在加入合霉素后菌体蛋白质的含量亦见减少，减少的程度与敏感菌株相似。同时从培养基中蛋白质含量的变化来看，加药后培养基中蛋白质含量有显著的增加。这种现象与敏感菌株不同，可能是由于加药后膜的透过性改变，部分蛋白质从菌体漏出，因而使菌体蛋白质的含量下降，而培养基中蛋白质含量却见增多。因此，我们认为耐药菌株菌体蛋白质含量的降低，可能并非由于合霉素抑制蛋白质的合成，而是细胞膜对蛋白质透过性改变所致。Ramsey 氏^[28] 曾以耐氯霉素的金黄色葡萄球菌进行研究，亦发现氯霉素对耐药菌株的蛋白质合成无抑制作用。从合霉素对敏感菌株和耐药菌株的蛋白质代谢的影响不同，可以设想，敏感菌株与耐药菌株的蛋白质代谢途径的不同，可能是产生耐药性的原因之一。

其次，菌体中核糖核酸的含量于加入合霉素以后有显著的增加。Gale^[10-12]、Neidhardt^[29]等氏在研究氯霉素的作用机制时，亦发现有同样的现象。加入合霉素以后菌体中核糖核酸含量的增加可能是由于细菌的繁殖受到抑制，而核糖核酸的合成仍继续进行，因而核糖核酸在菌体内发生积聚。

在氨基酸的代谢方面，二菌株的转氨酶均未受影响，但菌体内游离氨基酸的种类在敏感菌株与耐药菌株内却完全不相同。敏感菌株有丝氨酸、胱氨酸、酥氨酸；而耐药菌株则有甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、谷氨酸。并且在敏感菌株的培养液中出现原来培养基中没有的氨基酸，如缬氨酸。从以上情况来看，可以认为敏感菌株与耐药菌株对氨基酸的需要和

合成的能力各不相同。因为游离氨基酸的存在可以間接表示細菌細胞对这些氨基酸的需要^[30]。在加入合霉素以后,菌体中游离氨基酸的种类均見减少,只有甘氨酸一种,尤以耐药菌株的减少最为显著,其他抗菌素(如短杆菌酪肽^[31])也有此种作用。发生这种改变的原因有以下几个可能:(1)細胞膜的吸收功能受到合霉素作用后发生障碍;(2)細胞代謝方式发生改变,合成氨基酸的能力加强,因而不需要外来氨基酸的供給。葡萄球菌对青霉素产生耐药性后,也呈现同样的情况^[32]。合霉素所引起的这种现象,究竟属于哪一种可能,还有待进一步探討。加药后耐药菌株对谷氨酸的脱羧和脱氨作用均被抑制。但敏感菌株对谷氨酸的脱羧和脱氨作用于加入合霉素以后却未見有抑制作用,而且耐药菌株对谷氨酸的脱羧作用較敏感菌株为差。Грюнбергред 等氏^[33]曾报导对氯霉素耐药的大腸杆菌的谷氨酸脱羧酶活性較敏感菌株为低。这方面与我們的結果一致。从以上的結果来看,耐药菌株的氨基酸代謝与敏感菌株是不同的。

菌体的磷脂在加入合霉素后含量增加。磷脂系革兰氏阴性細菌的細胞膜的重要组成部分之一^[34],它与細菌細胞的透过性有着密切的关系。加入合霉素以后,磷脂含量增加,因而可能改变細菌細胞膜的结构,影响細胞的透过能力。Vácz 等氏^[35]认为細菌細胞类脂含量的增加可以阻碍抗菌素进入細胞,因而是細菌对抗抗菌素的一种保护功能。Few 和 Schulman 二氏^[35]亦发现磷脂比例的改变,青霉素即难于透入。Vácz 等氏^[34, 37]还报告了对氯霉素耐药的菌株的类脂含量較敏感菌株为多,然在我們的实验中,耐药菌株的磷脂含量却比敏感菌株稍少。

从实验的材料来看,可以认为合霉素对敏感菌株的菌体蛋白質合成具有抑制作用,对于本菌氨基酸代謝和磷脂含量等均有不同程度的影响。敏感菌株与耐药菌株在蛋白質代謝,氨基酸的需要和合成代謝等方面,均有不同。这些可能是产生耐药性原因的一个方面。

四、摘 要

1. 本研究用从临床分离的对合霉素敏感及耐药的福氏痢疾杆菌 IIa 型各一株,对它們的含氮、磷化合物的代謝以及合霉素对这些代謝的影响进行了比較观察。
2. 合霉素对敏感菌株的菌体蛋白質合成有抑制作用,而对耐药菌株的菌体蛋白質合成則无抑制作用。
3. 在合霉素的作用下,菌体核糖核酸的含量有明显的增多。
4. 敏感菌株和耐药菌株的菌体游离氨基酸的种类不相同,加入合霉素后氨基酸种类均有减少,尤以耐药菌株为显著。
5. 合霉素对于耐药菌株对谷氨酸的脱羧和脱氨作用均有抑制作用。
6. 加入合霉素后,菌体内磷脂含量增多。
7. 从实验材料来看,敏感菌株与耐药菌株在蛋白質代謝、氨基酸的需要和合成能力等方面均有不同。

参 考 文 献

- [1] McLean, S. W., Jr., et al.: *J. Clin. Invest.*, **28**:953, 1949.
- [2] Meads, M., et al.: *ibid.*, **29**:1474, 1950.
- [3] Coffey, G. L., et al.: *J. Inf. Dis.*, **87**:142, 1950.
- [4] Pansey, F. E., et al.: *Proc. Soc. Expt. Biol. & Med.*, **75**:618, 1950.
- [5] Marberg, K. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**:51, 1958.
- [6] Váczi, L., et al.: *Acta Microbiol. Hung.*, **5**:151, 1958.
- [7] Olarte, J., & De La Tone, J. H.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **8**:324, 1959.
- [8] Koch, M. L.: *Antib. & Chemoth.*, **10**:364, 1960.
- [9] Wyss, O., et al.: *Bact. Rev.*, **17**:17, 1953.
- [10] Gale, E. F. and Paine, T. F.: *Biochem. J.*, **47**:xxvi, 1950.
- [11] Gale, E. F. and Paine, T. F.: *ibid.*, **48**:298, 1951.
- [12] Gale, E. F. and Folkes, J. P.: *ibid.*, **53**:495, 1953.
- [13] Wissemann, C. L., Jr., et al.: *Bact. Proc.*, **94**, 1952.
- [14] Wissemann, C. L., Jr., et al.: *J. Bact.*, **67**:662, 1954.
- [15] Maxwell, R. E., & Nickel, V. S.: *Antib. & Chemoth.*, **4**:289, 1954.
- [16] Harrington, M. G.: *J. Gen. Microbiol.*, **18**:767, 1958.
- [17] Doudney, C. O.: *J. Bact.*, **79**:122, 1960.
- [18] Gale, E. F.: *J. Gen. Microbiol.*, **1**:53, 1947.
- [19] Umbreit, W. W., et al.: *Manometric techniques*, Butterworth Publishing Co., 1957.
- [20] Ma, T. S., & Zuazaza, J.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **14**:280, 1942.
- [21] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **193**:265, 1951.
- [22] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **207**:1, 1954.
- [23] Dische, Z.: *J. Biol. Chem.*, **204**:988, 1953.
- [24] Seibert, F. B.: *J. Biol. Chem.*, **133**:593, 1940.
- [25] Tonhazy, N. E., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **28**:36, 1950.
- [26] 中国医学科学院实验医学研究所生化系讲义。
- [27] Bernlohr, R. W., & Webster, G. C.: *J. Bact.*, **76**:233, 1958.
- [28] Ramsey, H. H.: *Nature*, **182**:602, 1958.
- [29] Neidhardt, F. C., & Gros, F.: *Biochem. et Biophys. Acta*, **25**:513, 1957.
- [30] Taylor, E. S.: *J. Gen. Microbiol.*, **1**:86, 1947.
- [31] Gale, E. F., & Taylor, E. S.: *ibid.*, **1**:314, 1947.
- [32] Мороз, А. Ф.: *Антибиотики*, **5**(2):76, 1960.
- [33] Грюнбергред, Д. И. и др.: *Чехослов. хим. работ*, **21**:1023, 1956 (引自 Коротяев, А. И.: *Микробиол.*, **28**:851, 1959).
- [34] McQuillen, K.: *J. Gen. Microbiol.*, **18**:498, 1958.
- [35] Váczi, L., & Incze, P.: *Acta Microbiol. Hung.*, **5**:197, 1958.
- [36] Few, A. V., & Schulman, J. H.: *Biochem. et Biophys. Acta*, **10**:302, 1953.
- [37] Váczi, L., et al.: *Acta Microbiol. Hung.*, **4**:437, 1957.

STUDIES ON THE MODE OF ACTION OF SYNTOMYCIN

I. EFFECT OF SYNTOMYCIN ON NITROGEN AND PHOSPHORUS METABOLISM IN *SH. FLEXNERI*

CHEN CHI-PEN*

(Nanking College of Pharmacy)

1. In the present paper, comparative studies in the presence and absence of syntomycin, on the nitrogen and phosphorus metabolism of syntomycin-sensitive and resistant strains of *Sh. flexneri* type IIa recently isolated from patients have been made and some significant results were obtained.
2. Syntomycin showed an inhibitory action on the protein synthesis of the sensitive strains but had no such effect on the resistant strain.
3. In the presence of syntomycin, the RNA content of the cells increased greatly.
4. There was also a difference in the free amino acid contents of these two organisms. After the addition of syntomycin to the culture medium, a decrease in the number of types of amino acids was found, which was more marked in the case of the resistant strain.
5. Syntomycin appeared to inhibit the decarboxylation and deamination of glutamic acid by the resistant strain.
6. The addition of syntomycin to the culture medium also resulted in an increase in the content of phospholipid.
7. The authors concluded that from the results of the experiment it seemed that protein metabolism, amino acid requirements, and the ability to synthesize amino acids by syntomycin-resistant organism was different from those by the sensitive strain.

* Under the direction of Prof. Chang Kuang-hou, the Medical College of China, Peking.